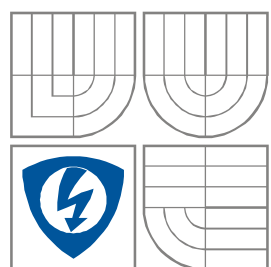


VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V  
BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA ELEKTROTECHNIKY A  
KOMUNIKAČNÍCH  
TECHNOLOGIÍ

ÚSTAV ELEKTROTECHNOLOGIE

FACULTY OF ELECTRICAL ENGINEERING AND  
COMMUNICATION

DEPARTMENT OF ELECTRICAL AND ELECTRONIC  
TECHNOLOGY

## IMPLANTÁTY PRE NERVOVÝ SYSTÉM

IMPLANTS FOR NERVOUS SYSTEM

BAKALÁRSKA PRÁCA  
BACHELOR'S THESIS

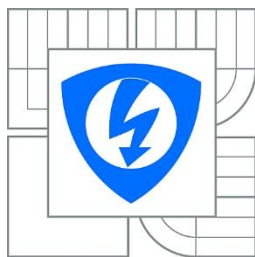
AUTOR PRÁCE  
AUTHOR

Lukáš Kuruc

VEDOUCÍ PRÁCE  
SUPERVISOR

doc. Ing. Marie Sedlaříková, CSc.

BRNO 2014



**VYSOKÉ UČENÍ  
TECHNICKÉ V BRNĚ**

**Fakulta elektrotechniky  
a komunikačních technologií**

**Ústav elektrotechnologie**

# **Bakalářská práce**

bakalářský studijní obor  
**Mikroelektronika a technologie**

**Student:** Lukáš Kuruc  
**Ročník:** 3

**ID:** 146883  
**Akademický rok:** 2013/2014

**NÁZEV TÉMATU:**

**Implantáty pro nervový systém**

## **POKYNY PRO VYPRACOVÁNÍ:**

Prostudujte literaturu, zabývající se materiály pro implantáty do nervového systému.  
Navrhněte způsob přípravy těchto implantátů na bázi akrylových polymerů.  
Připravte vzorky a sledujte jejich strukturu pomocí mikroskopu. Průchodnost pórů otestujte detekčními tekutinami.  
Zdůvodněte vhodnost použití pro nervový systém.

## **DOPORUČENÁ LITERATÚRA:**

Podle pokynů vedoucí bakalářské práce.

**Termín zadání:** 10.2.2014

**Termín odevzdání:** 5.6.2014

**Vedoucí práce:** doc. Ing. Marie Sedlářková, CSc.

**Konzultanti semestrální práce:**

**doc. Ing. Jiří Háze, Ph.D.**  
*Předseda oborové rady*

## **UPOZORNĚNÍ:**

Autor bakalářské práce nesmí při vytváření bakalářské práce porušit autorská práva třetích osob, zejména nesmí zasahovat nedovoleným způsobem do cizích autorských práv osobnostních a musí si být plně vědom následků porušení ustanovení § 11 a následujících autorského zákona č. 121/2000 Sb., včetně možných trestněprávních důsledků vyplývajících z ustanovení části druhé, hlavy VI. díl 4 Trestního zákoníku č.40/2009 Sb.

**Abstrakt:**

Predkladaná bakalárska práca sa zaoberá problematikou implantátov pre nervovú sústavu. Prvá časť je zameraná na teoretický rozbor tejto problematiky. Zahŕňa oboznámenie čitateľa s vážnosťou poranenia miechy, možnosti jej liečenia a regenerácie pomocou hydrogélových implantátov. V druhej časti je popísaná experimentálna výroba implantátov, testovanie priechodnosti implantátov a zhrnutie ich vlastností.

**Kľúčové slová:**

Implantáty, nervová sústava, poranenie miechy, hydrogél, HEMA, tkanivové inžinierstvo

**Abstract:**

This thesis deals with implants for nervous system. The first part of this thesis focuses on theoretical analysis of this issue, makes reader familiar with seriousness of spinal cord injury, its treatments options and regeneration with hydrogel implants. The second part describes experimental manufacturing of implants, testing patency and summary of their properties.

**Keywords:**

Implants, nervous system, spinal cord injury, hydrogel, HEMA, tissue engineering

## Bibliografická citácia mojej práce:

KURUC, L. *Implantáty pro nervový systém*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií, 2014. 41 s. Vedoucí bakalářské práce doc. Ing. Marie Sedlářiková, CSc..

## **Prehlásenie**

Prehlasujem, že svoju bakalársku prácu na tému „Implantáty pre nervový systém“ som vypracoval samostatne pod vedením vedúceho bakalárskej práce a s použitím odbornej literatúry a ďalších informačných zdrojov, ktoré sú všetky citované v práci a uvedené v zozname literatúry na konci práce.

Ako autor uvedenej bakalárskej práce ďalej prehlasujem, že v súvislosti s vytvorením tohto projektu som neporušil autorské práva tretích osôb, hlavne som nezasiahol nedovoleným spôsobom do cudzích autorských práv tretích osôb a som si plne vedomý následkov porušení ustanovení § 11 a nasledujúcich autorského zákona č.121/2000 Sb., vrátane možných trestnoprávných dôsledkov vyplývajúcich z ustanovenia § 152 trestného zákona č. 140/1961 Sb.

V Brne dňa 1. júna 2014

.....  
podpis autora

## **PodĎakovanie**

Ďakujem vedúcej bakalárskej práce doc. Ing. Marii Sedlárikovej, CSc. za účinnú metodickú, pedagogickú a odbornú pomoc a ďalšie cenné rady pri spracovaní projektu.

V Brne dňa 1. júna 2014

.....  
podpis autora

# Obsah

<b>Zoznam obrázkov .....</b>	<b>7</b>
<b>Zoznam tabuliek .....</b>	<b>7</b>
<b>ÚVOD .....</b>	<b>8</b>
<b>1 TEORETICKÁ ČASŤ .....</b>	<b>9</b>
1.1 Poranenie miechy .....	9
1.2 Makromolekulárne zlúčeniny .....	11
1.3 Hydrogély .....	13
1.4 Hydrogély prírodného pôvodu .....	14
1.5 Syntetické hydrogély - makroporézne hydrogély založené na 2-hydroxid ethylmethakryláte (HEMA).....	15
1.6 Charakterizácia hydrogélův.....	16
1.7 Tkanivové inžinierstvo .....	17
1.8 Nanovlákná a technológia elektrospinningu .....	18
1.9 Detekcia priechodnosti materiálov .....	20
1.9.1 Kapilárne metódy .....	20
1.9.2 Penetranty .....	22
1.9.3 Vývojky.....	23
<b>2 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ .....</b>	<b>25</b>
2.1 Návrh aparatury .....	25
2.2 Návrh zmesi .....	27
2.2.1 Dentakrylový implantát s KCl .....	27
2.2.2 Dentakrylový implantát s NaCl.....	28
2.2.3 HEMA.....	29
2.3 Výpočty množstva pórov v implantátoch .....	34
2.4 Testovanie priechodnosti vzorkov kapilárnou metódou .....	35
<b>ZÁVER .....</b>	<b>39</b>
<b>ZOZNAM LITERATÚRY.....</b>	<b>40</b>

## Zoznam obrázkov

Obrázok 1 Schematická reprezentácia poranenia miechy [5] .....	10
Obrázok 2 Štruktúra kyseliny hyalurónovej [20] .....	14
Obrázok 3 Monomér, 2-hydroxidethylmethakrylát [6] .....	15
Obrázok 4 Schematická ilustrácia základnej paradigmy tkanivového inžinierstva [17].....	17
Obrázok 5 a) Obrázok pHEMA schránky s tunelmi b) Makroskopická architektúra hydrogél z agarózy c) Priečny rez polystyrénovou maticou [5].....	18
Obrázok 6 Schematická ilustrácia elektrospinningu [9].....	18
Obrázok 7 Nanovlákná zosnímané elektrónovým mikroskopom [18].....	19
Obrázok 8 Aparatúra na výrobu hydrogél [15] .....	25
Obrázok 9 Návrh aparatury [15].....	25
Obrázok 10 Forma na UV vytvrdzovanie polyméru .....	26
Obrázok 11 Dentakryl s KCl - povrchová štruktúra.....	27
Obrázok 12 Dentakryl s KCl - povrchová štruktúra.....	28
Obrázok 13 Dentakryl - vyplavená NaCl .....	28
Obrázok 14 Dentakryl - NaCl usporiadaná na povrchu .....	29
Obrázok 15 HEMA - povrchová štruktúra .....	30
Obrázok 16 HEMA - pohľad na porézny povrch .....	31
Obrázok 17 HEMA - bližší pohľad na samotný pór.....	31
Obrázok 18 M68 penetrant [12] .....	35
Obrázok 19 Vývojka CRC Crick 130 [11] .....	35

## Zoznam tabuliek

Tabuľka 1 Metódy nedeštruktívneho skúšania [8] .....	20
Tabuľka 2 Zloženie jednotlivých implantátov .....	32
Tabuľka 3 Prehľad vlastností implantátov .....	33

# ÚVOD

Jednou zo základných úloh tkanivového inžinierstva je premostiť poranenú miechu a obnoviť poškodené spojenie. Na tieto účely sa používajú materiály zvané hydrogély. Hydrogély sú biokompatibilné implantáty používané na opravu poškodenej miechy. Dokážu vytvoriť priaznivé prostredie a premostiť poškodené oblasti poskytnutím lešenia pre regeneráciu neurónov. Výhodou využívania týchto umelých materiálov je možnosť upravovať ich fyzikálne a chemické vlastnosti, vďaka čomu je možné vytvoriť najlepší implantát na opravu miechy.

Predložená bakalárska práca sa zaoberá teoretickým rozborom problematiky poranenia miechy, materiálov používaných na opravu miechy a praktickou prípravou vzoriek.

Mojou motiváciou pri riešení tejto bakalárskej práce je záujem o medicínu a chuť rozširovať obzory sebe aj iným v oblastiach, ktoré nie sú veľmi rozšírené v povedomí ľudí.



# 1 TEORETICKÁ ČASŤ

## 1.1 Poranenie miechy

Hlavnou príčinou poranení miechy sú automobilové nehody, až 47 % zo všetkých prípadov. Nasledujú nehody pri športe (27 %), pády (12 %) a násilné poranenia (7 %). Poranenie miechy je častokrát spôsobené stlačením miechy fragmentom kosti, posunutím stavca alebo jeho častí. [4]

Poranenie miechy ústí stále do straty neurónov a degenerácií na poškodenom mieste, ktorá spôsobuje pohybové problémy. Momentálne neexistuje žiadna efektívna liečba. Dlhodobá terapia sa sústreďuje na rehabilitáciu a prevenciu komplikácií. Avšak, schopnosť regenerácie centrálného nervového systému je veľmi obmedzená. V oblasti poškodenia sa s väčšou pravdepodobnosťou vytvorí gliálna<sup>1</sup> jazva ako normálne tkanivo. Jazva obsahuje substancie, ktoré zabráňujú rastu axónov<sup>2</sup> a vytvárajú fyzickú bariéru, ktorá oddeľuje poškodené tkanivo od zvyšku centrálnej nervovej sústavy. Obnova tkaniva vyžaduje vytvorenie metódy, ktorá by zabezpečovala rekonštrukciu šedej a bielej hmoty. [16]

Na začiatku poskytuje gliálna jazva dôležitú funkciu v obnove hematoencefalickej bariéry<sup>3</sup> tým, že oddelí poškodené miesto od zdravého tkaniva. Avšak nakoniec sa stane lepkavou a pružnou membránou naplnenou molekulami ktoré obmedzujú rast axónov, teda je príčinou neúspechu nervovej regenerácie. [5]

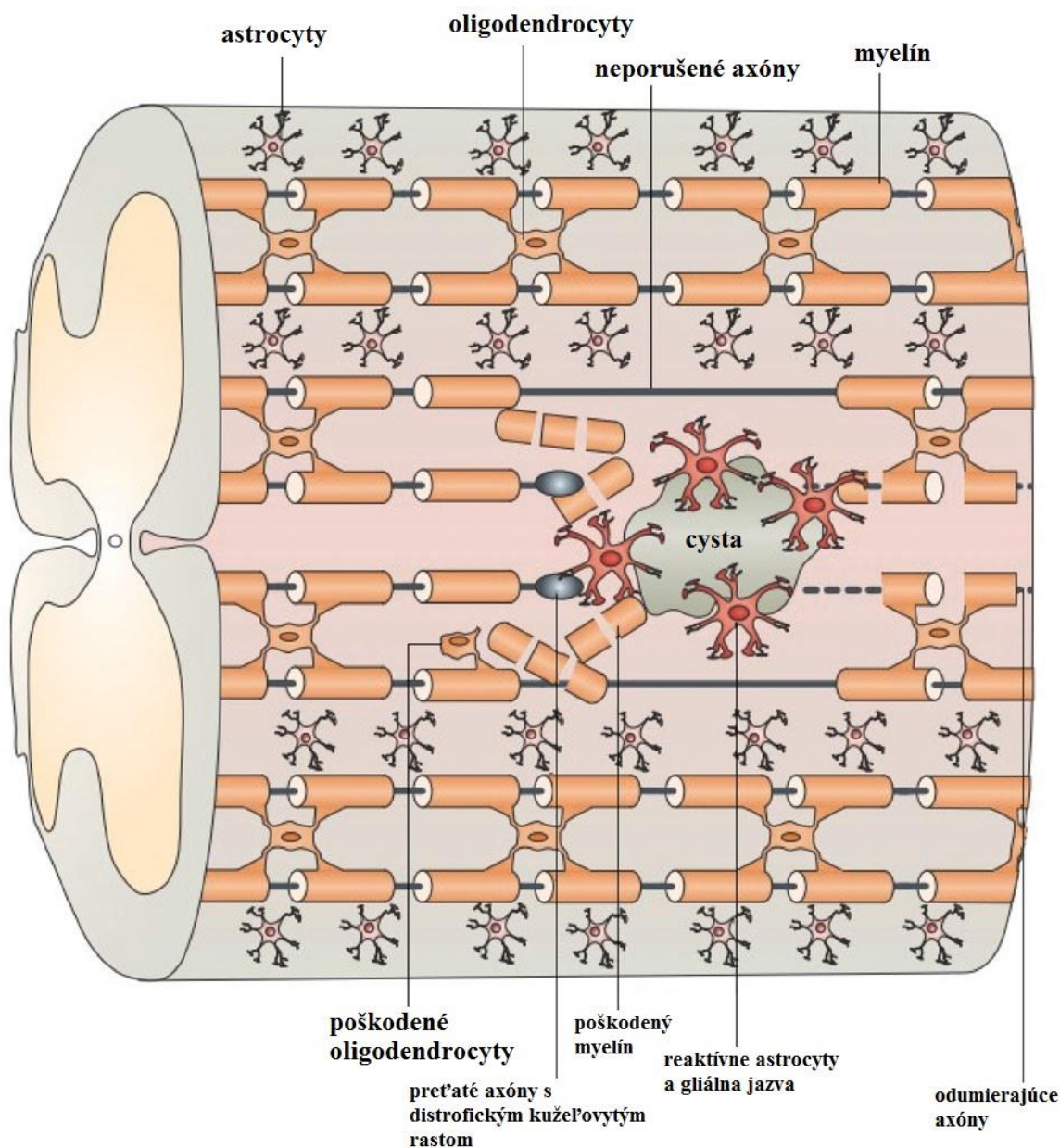
---

<sup>1</sup> Gliálna bunka – obklopuje neuróny, zásobuje ich živinami a kyslíkom

<sup>2</sup> Axón – nervová bunka, vedie informáciu (nervový vzruch) od tela neurónu

<sup>3</sup> Hematoencefalická bariéra – fyziologická bariéra medzi krvným obehom a CNS

Štruktúra poškodených axónov, aktivácia gliálnych buniek a tvar gliálnej jazvy je na Obrázku 1.



Obrázok 1 Schematická reprezentácia poranenia miechy [5]

Je možno použiť viacero metód na opravu miechy, napríklad implementovať nervové bunky In vivo, použiť bunky kostnej drene ako nástroj na opravu alebo použiť hydrogélové materiály, ktorými sa budem zaoberať v tejto bakalárskej práci.

## 1.2 Makromolekulárne zlúčeniny

V priebehu 19. storočia sa rada chemikov zaoberala modifikáciou prírodných polymérov s cieľom získať materiály s výhodnými úžitkovými vlastnosťami. V roku 1839 sa podarilo C.Goodyearovi pôsobením tepla a síry premeniť prírodný lepivý kaučuk na vysoko elastickú gumu – bola tak objavená vulkanizácia kaučuku.

V dvadsiatych rokoch minulého storočia publikoval Hermann Staudinger svoj názor na existenciu dlhých reťazcových molekúl, v ktorých sú kovalentnými väzbami navzájom viazané nízkomolekulárne štruktúry látok. Pozoruhodné vlastnosti polymerných látok vysvetlil intermolekulárnymi väzbami medzi molekulami s vysokou molekulárnou hmotnosťou. H. Staudinger, ktorý je považovaný za zakladateľa oboru makromolekulárna chémia, taktiež zaviedol pojem makromolekula.

Potom, čo bola objavená skutočná molekulárna štruktúra polymérov a naznačený postup ako by bolo možné látky tvorené ohromnými reťazovými molekulami cielene pripravovať, došlo k rýchlemu rozvoju syntézy rôznych polymérov a zavedeniu ich priemyselnej výroby. [14]

Polyméry majú veľké molekuly. Ich relatívna molekulová hmotnosť sa pohybuje od desiatok tisíc do miliónov, je teda rádovo vyššia ako u ostatných, tzv. nízkomolekulárnych látok.

Makromolekuly môžu vzniknúť buď z cyklických molekúl monoméru, čo sú napríklad étery oxiran a trioxan, cyklosiloxany, cyklotrifosfazeny, alebo z molekúl obsahujúcich aspoň jednu dvojnú väzbu. V týchto prípadoch je pospojovanie molekúl monoméru v makromolekule polyméru jednoznačné. V prípade, že má molekula monoméru aspoň dve dvojnú väzby, však adícia pri vzniku makromolekuly už nie je jednoznačná. [14]

Z molekuly monoméru sa jej zabudovaním do makromolekuly polyméru stane základná stavebná častica makromolekuly, ktorú nazývame mér<sup>4</sup>. Makromolekulu polyméru teda môžeme prirovnať k reťazu, ktorého článkom je mér. Polyméry s makromolekulovými reťazcami prvého typu, akými sú napríklad polyetylén, polystyrén, polyakrylonitril ale aj polyvinylchlorid, ktorých reťazce môžeme označiť AAAAAAAAAA, ak A označuje mér, nazývame homopolyméry. Polyméry druhého typu sa bližšie označujú ako kopolyméry. [2]

---

<sup>4</sup> mér – pravidelne sa opakujúca časť makromolekuly, ktorá má rovnaké zloženie

Tie sa ďalej delia na: štatistické, blokové, vrúbľované. Blokové a vrúbľované kopolyméry sa odlišujú vlastnosťami od štatistických aj pri rovnakom chemickom zložení. To preto, že jednotlivé kopolymérne bloky sú dostatočne veľké, aby výsledný blokový alebo vrúbľovaný kopolymér nestratil všetky vlastnosti odpovedajúcich homopolymérov, ale zhrňoval ich kvality a navyše sa vyznačoval vlastnosťami ktoré nemá žiaden z homopolymérov.

Schématický znázornený rozdeľovanie kopolymérov:

- štatistické – ich reťazce sú tvorené nepravidelne, so štatisticky náhodne sa striedajúcimi mermi AAABAABBBAAABAB
- blokové – ich reťazce sú tvorené dvoma alebo viac blokmi merov jedného druhu AAAAAAABBBBBBBB
- vrúbľované<sup>5</sup> – ktoré majú na základnom reťazci merov jedného druhu „navrúbľované“ postranné reťazce merov iného druhu  
AAAAA  
B B  
B B  
B B  
B B  
B B

[2]

---

<sup>5</sup> český ekvivalent - roubovaný

## 1.3 Hydrogély

Podľa posledných lekárskeých a farmaceutických encyklopédií, stále neexistuje presná definícia pojmu hydrogél. Najčastejšie je hydrogél považovaný za materiál, ktorý je vyrobený tak, že vodou nerozpustný polymér absorbuje veľké množstvo vody, alebo je to jednoducho vodou zmáčaná polymérová štruktúra. [3]

Hydrogély sú teda sieťované hydrofilné polyméry. Majú vysoký obsah vody (až 98 %) a môžu mať pórovitú štruktúru s veľkosťou pórov medzi 10-100  $\mu\text{m}$  (makroporézny hydrogél). História použitia hydrogélů v medicíne je veľká a ich dôležitosť stále narastá. V oprave poškodenia miechy slúžia ako most pre rast axónov. Takisto sú prevenciou zjazvenia a teda vytvárajú vhodné prostredie na regeneráciu tkaniva. S ich trojdimenzionálnou poréznu štruktúrou poskytujú acelulárnu<sup>6</sup> mechanickú schránku pre rast podporného tkaniva a spolu s ďalšími stratégiami podpornej regenerácie, môžu prispieť k regenerácii po poškodení miechy. [4]

Niektoré vlastnosti ich predurčujú ako najslubnejšie v oblasti tkanivového inžinierstva:

- Môžu byť syntetizované a vyrobené vo veľkých množstvách.
- Chemické a fyzikálne vlastnosti sa dajú jednoducho modifikovať a pripraviť pre okamžité použitie v prípade operácie.
- Difúzne parametre v implantovaných hydrogélůch dosahujú potrebných hodnôt k vytvoreniu nervového tkaniva.

Dôležitým faktorom pre tkanivové inžinierstvo je degradačné správanie sa hydrogélů, biodegradabilita je dôležitá pri použití hydrogélů ako dočasnej schránky. Ideálnou situáciou je ak hydrogélůvá schránka degraduje *in vivo* na neškodné metabolity<sup>7</sup>, v tom momente ako sa nervové tkanivo zregeneruje. Ďalšou atraktívnou vlastnosťou je odpoveď na stimuláciu prostredím, ako sú zmeny pH, teploty a množstvo iónov. Kontrolou týchto vonkajších podmienok, je možné modifikovať rast niektorých chemických hydrogélů a sol-gél<sup>8</sup> fázu niektorých hydrogélů. Aj keď je primárne zameraný na systém podávania liekov, teplotne kontrolovaný sol-gél prechod je fascinujúci pre aplikácie tkanivového inžinierstva, pretože umožňuje zaviesť hydrogél do hostiteľského systému cez neinvazívne metódy. [17]

---

<sup>6</sup> acelulárny - nebunečný

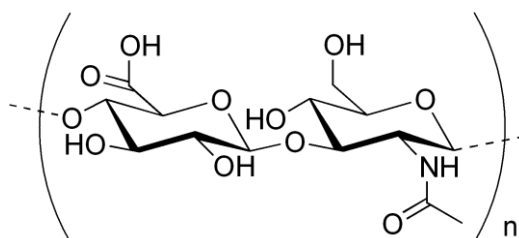
<sup>7</sup> metabolit – produkt látkovej premeny (metabolizmu), sú to obvykle malé molekuly bielkovín

<sup>8</sup> sol-gél – koloidná suspenzia, ktorá môže byť premenená na pevnú látku (gél)

Najzákladnejšou fyzikálnou vlastnosťou hydrogélou je veľkosť pórov (tzv. mesh). Ich veľkosť sa vzťahuje priamo na množstvo ďalších fyzikálnych parametrov, vrátane schopnosti zmeny polyméru na hydratovaný gél, absorpcia vody, hustota kríženia, elastická pevnosť a hydraulická permeabilita, z čoho všetky parametre sú navzájom prepojené. Mechanické vlastnosti hydrogélou môžu byť extrémne dôležité ak sú použité v aplikáciách nosných štruktúr. Napriek tomu, že hydrogély preukázali schopnosť variability ich aplikácií, hlavným nedostatkom k ich rozšíreniu sú ich slabé mechanické vlastnosti. Prítomnosť veľkého množstva vody, ktorá zvyšuje biokompatibilitu tak činí na úkor mechanickej integrity. [17]

## 1.4 Hydrogély prírodného pôvodu

Kyselina hyalurónová (KH) je extrémne dlhý, s vysokou molekulovou hmotnosťou, záporne nabitý, veľmi hydratovaný glykosaminoglykan. Je rozšírený skoro v každej mimobunkovej hmote, obzvlášť v centrálnej nervovej sústave.



Obrázok 2 Štruktúra kyseliny hyalurónovej [20]

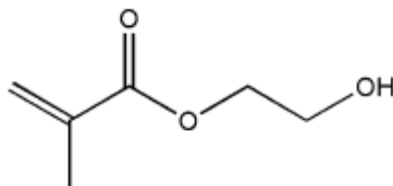
Vzhľadom na ich mechanické vlastnosti a biologické vlastnosti, hydrogély na báze KH sú používané v širokom rozsahu fyziologických a patologických procesoch a boli použité aj ako biokompatibilné schránky v tkanivovom inžinierstve. [5]

Chemické modifikácie umožňujú zmenu fyzikálno-chemických vlastností a dobu pobytu KH in vivo na mieru pre špecifické aplikácie pri zachovaní jej prirodzenej biokompatibility, biodegradability a malej reakcie imunitného systému. [10]

Pokusy s potkanmi ukázali, že KH je schopná zamedziť vytvoreniu jazvy a tým napomôcť k procesu hojenia. Avšak, sú úvahy, že to dokážu iba formy KH s vysokou molekulárnou hmotnosťou, zatiaľ čo u tých s nízkou molekulárnou hmotnosťou sa predpokladá zvýšenie proliferácie buniek<sup>9</sup> a zápalu. [5]

<sup>9</sup> Proliferácia buniek – bujnenie, chorobný rast buniek

## 1.5 Syntetické hydrogély - makroporézne hydrogély založené na 2-hydroxid ethylmethakryláte (HEMA)



Obrázok 3 Monomér, 2-hydroxidethylmethakrylát [6]

Hydrogély založené na poly(2-hydroxidethylmethakryláte) patria do skupiny syntetických biokompatibilných polymérov. HEMA je jedným z najdôležitejších a široko používaným hydrogélovým biomateriálom. Od roku 1955 bola modifikovaná mnohými prírodnými a syntetickými substanciami a rôznymi metódami, a bola používaná vo výrobe kontaktných šošoviek, podávaní liekov a pre účely tkanivového inžinierstva. Vlastnosti polyHEMA materiálu závisia, popri iných, na metóde syntézy, obsahu polyméru, stupni sieťovania, teplote a na finálnom aplikačnom prostredí. [3]

Dôležitým parametrom je poréznosť, ktorú možno dosiahnuť štyrmi základnými postupmi výroby:

1. Krížová polymerizácia v prítomnosti substancií, ktoré sú rozpúšťadlami pre monoméry ale zahusťovadlom pre vytvorený polymér.
2. Krížová polymerizácia v prítomnosti rozpustných substancií (cukrov, solí), ktoré sú vymyté z hydrogél po polymerizácií.
3. Krížová polymerizácia v prítomnosti substancií uvoľňujúcich plyny, ktoré zotrývajú vo výslednom hydrogéle.
4. Sublimáciou mrazom hydrogél nasyaknutého vodou. [17]

Na prípravu makroporézneho hydrogél je možné použiť monomér 2-hydroxid ethylmethakrylátu, reakčný iniciátor polymerizácie 2,2'-azobis(isobutyronitrile) pri vytvrdzovaní teplom alebo benzoin ethyl éter (BEE) pri vytvrdzovaní UV žiarením, ethylén dimethakrylát, ktorý zohráva úlohu pri vytváraní väzieb pri polymerizácií, polyethylénglykol a chlorid sodný (NaCl).[15]

Chlorid sodný zohráva dôležitú úlohu pri použití hydrogélů v tkanivovom inžinierstve, pretože po jeho vyplavení ostanú v gélovom materiáli otvory a tunely vhodné na rast a vývin nervových buniek. Veľkosť kryštálov môže byť rôznorodá, ale ich priemer by sa mal pohybovať v rozmedzí veľkostí nervových buniek. Ich veľkosti sa pohybujú od 4 μm do 100 μm. Veľkosť kryštálov je dôležitým parametrom, pretože nervová bunka vyžaduje špecifické prostredie pre svoj rast.

## 1.6 Charakterizácia hydrogélů

Makroporézne hydrogély sú charakterizované nasledujúcimi veličinami:

1. Počet pórov v 1 cm<sup>3</sup> gélu, teda počet častíc chloridu sodného (n) :

$$n = m_{NaCl} / [\rho_{NaCl} \frac{4}{3} \pi (\frac{d}{2})^3 V_H] \quad (1)$$

kde  $\rho_{NaCl}$  je hustota chloridu sodného (2,16 g/cm<sup>3</sup>),  $d$  je priemerná veľkosť častíc chloridu sodného a  $V_H$  je objem vytvoreného vzorku

2. Celkové množstvo všetkých pórov v 1 cm<sup>3</sup> hydrogélů, čo je množstvo vody vo všetkých póroch ( $V_V$ )

$$V_V = \left[ V_H - \frac{m_H}{\rho_p} \right] / V_H \quad (2)$$

Kde  $\rho_p$  je hustota suchého polyméru (1,2 g/cm<sup>3</sup>)

3. Priemerný objem jedného póru

$$d_H = 2 \sqrt[3]{3V_1/4\pi} \quad (3)$$

4. Celková plocha všetkých pórov v 1 cm<sup>3</sup> makroporézneho hydrogélů:

$$S = 4\pi \left( \frac{d_H}{2} \right)^2 n \quad (4)$$

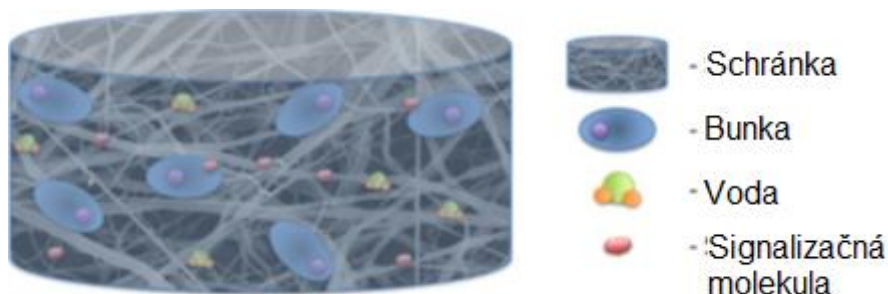
Tieto rovnice som prevzal z literatúry. [15]



## 1.7 Tkanivové inžinierstvo

Aplikácia biomateriálov v tkanivovom inžinierstve a regeneračnej medicíny je predmetom záujmu viacerých inštitúcií. Súčasné prístupy k ošetrovaniu výrazného poškodenia tkaniva zahŕňujú chirurgické náhrady, rovnako ako v prípade kovovo-polymérnej kĺbovej náhrady alebo v transplantácií tkaniva. Chirurgické implantáty založené na technických materiáloch neposkytujú takú funkčnosť v spolupráci so živým biologickým tkanivom. [17]

Veľkou výzvou tkanivového inžinierstva je odstrániť tieto nedostatky alternatívnymi metódami. Objavujúce sa alternatívy sú zväčša „biomimetické“<sup>10</sup> v tom zmysle, ak zvážime kompozíciu a štruktúru prírodného živého tkaniva a snahu napodobniť ho za účelom vytvorenia nového funkčného tkaniva. Ako sú biologické materiály viaczložkové – tkanivo obsahuje bunky obklopené medzibunečnou hmotou (MBH) – tkanivové inžinierstvo prichádza s technikami takisto viaczložkovými, založenými na schránkach z biomateriálov (náhrada za prirodzenú MBH) so živými bunkami a bioaktívnymi faktormi. Na obrázku 4 je ilustrovaná základná paradigma tkanivového inžinierstva. Kľúčovými komponentami sú: pórovitá schránka z biomateriálu, živé bunky, voda a signálová molekula. [17]

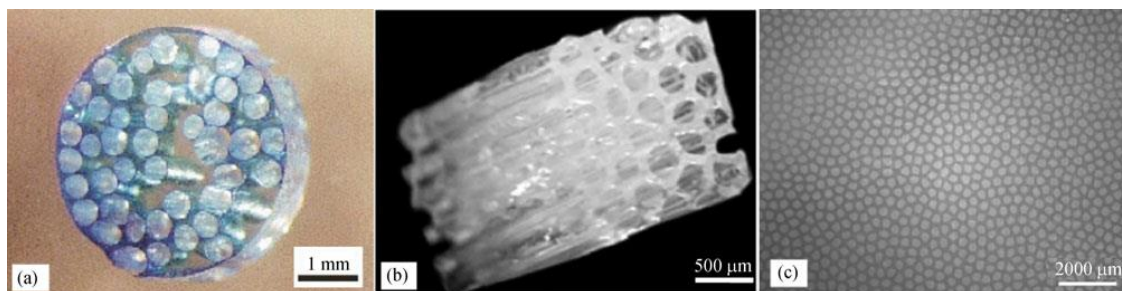


Obrázok 4 Schematická ilustrácia základnej paradigmy tkanivového inžinierstva [17]

Bolo použitých viacero výrobných metód z dôvodu overenia efektu makro architektúry schránok na regeneráciu CNS. Zavedenie pozdĺžnej rúrkovitej štruktúry môže poskytnúť fyzické riadenie pre opätovný rast axónov a migráciu buniek a tým zrýchliť nervovú regeneráciu. [5]

<sup>10</sup> biomimetický – napodobňujúci biologický materiál

Obrázok 5 ukazuje pozdĺžne rúrkovité štruktúry vyrobené pomocou foriem. Nie je prekvapením, že schránky s pozdĺžnymi rúrkovitými štruktúrami lepšie podporili rast axónov ako náhodné pórovité štruktúry. [5]

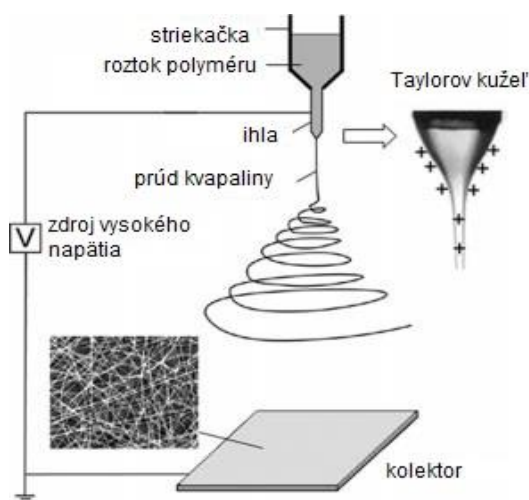


Obrázok 5 a) Obrázok pHEMA schránky s tunelmi b) Makroskopická architektúra hydrogélu z agarózy c) Priečny rez polystyrénovou maticou [5]

## 1.8 Nanovláčna a technológia elektrospinningu

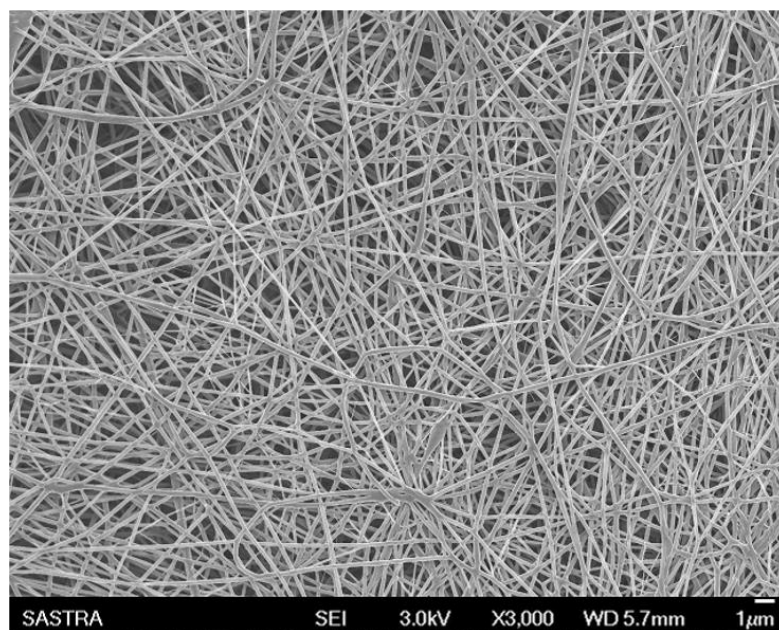
V procese elektrospinningu, je polymérový roztok držaný svojím povrchovým napätím na konci kapiláry a je vystavený elektrickému poľu. Náboj je indukovaný na tekutom povrchu elektrickým poľom. Vzájomný odpor nábojov vyvolá silu pôsobiacu proti smeru povrchového napätia. Ako intenzita elektrického poľa narastá, pologuľatý povrch roztoku na konci kapiláry sa predlžuje a vytvára kónický tvar, známy ako Taylorov kužeľ. V okamihu keď elektrické pole dosiahne kritickú hodnotu v ktorej odpudivá sila prekoná povrchové napätie, nabitý prúd roztoku je vyvrhnutý zo špičky Taylorovho kužeľa. Keďže je prúd nabitý, jeho trajektória môže byť usmernená elektrickým poľom. [1]

Obrázok 6 ukazuje schematickú ilustráciu základnej aparatury pre elektrospinning. Pozostáva z troch hlavných komponentov: zdroj vysokého napätia, kovovej ihly a z kolektoru (uzemnený vodič). [9]



Obrázok 6 Schematická ilustrácia elektrospinningu [9]

Elektrospinningom je možno jednoducho vytvoriť nanovlákná, ktoré sa ukazujú ako najslubnejší substrát v tkaninovom inžinierstve vďaka ich podobnosti k pôvodnej mimobunkovej hmote. Nanovláknó je široký pojem, ktorý vo všeobecnosti odkazuje na vláknité štruktúry s polomerom menším ako 1 mikrometer. Obrázok 7 ukazuje snímku nanovláknien PLGA-Polyanilínu s hladkou štruktúrou bez väd pre nervové tkanivové inžinierstvo. [18]



*Obrázok 7 Nanovlákná zosnímané elektrónovým mikroskopom [18]*

Neobyčajná mechanická pevnosť a veľký pomer plochy povrchu k objemu robí nanovlákná vhodnými pre nervové tkanivové inžinierstvo.

Pórovitá polymerická schránka z nanovláknien pripravená s použitím biodegradabilnej kyseliny poly L-laktídnej (PLLA) vyrobenej metódou fázovej separácie typu kvapalina – kvapalina sa podobá na medzibunkovú hmotu s prírodným kolagénom na podporu rastu neurónov a axónov. Avšak, je veľmi ťažké zachovať priemer a usporiadanie vlákien použitím tejto techniky. Okrem toho, boli spracované rozličné techniky na vytvorenie nanovláknien a to: syntéza šablóny, fázová separácia, kreslenie a elektrospinning. Aj napriek týmto technikám, elektrospinning ponúka viac výhod vďaka jeho jednoduchosti výroby. [18]

## 1.9 Detekcia priechodnosti materiálov

Dôležitým parametrom implantátov nie je len množstvo pórov, ale hlavne ich priechodnosť. Je množstvo spôsobov ako zistiť, či materiál obsahuje trhliny, defekty vo vnútri svojej štruktúry, ktoré nemožno voľným okom vidieť. V bežnej praxi sa to považuje za nežiadúci jav a zaoberá sa tým vedný obor defektoskopia. Pri výrobe implantátov sú ale trhliny, tunely a iné defekty žiadúcim javom a preto je možné využiť defektoskopické metódy, ktorých je niekoľko a ich členenie je v Tabuľke 1.

*Tabuľka 1 Metódy nedeštruktívneho skúšania [8]*

Metódy nedeštruktívneho skúšania	
Základné	Doplnkové
Vizuálna kontrola	Kontrola ultrazvukom
Kontrola prežiaréním	Skúšanie kapilárnymi metódami
	Skúšanie magnetickou práškovou metódou
	Skúšanie vírivými prúdmi
	Skúšanie tesnosti

### 1.9.1 Kapilárne metódy

Moderné kapilárne metódy sú samostatným oborom nedeštruktívneho skúšania materiálu. Využívajú kapilárnych vlastností niektorých kvapalín, zvaných penetranty, ku zisťovaniu povrchových necelistvostí materiálu. Zistenie vnútorných vád, ktoré nemajú spojenie so skúšaným povrchom, nie je týmito metódami možné. Hlavné prednosti kapilárnych metód spočívajú v ich principiálnej a aplikačnej jednoduchosti. Ďalšou výhodou je ich vysoká univerzálnosť, pretože tvarová zložitosť, rozmery a chemické zloženie skúšaných výrobkov nehrajú takú rolu ako u iných defektoskopických metód.

Kapilárne metódy sú založené na využití charakteristických vlastností fázových rozhraní a javov, označovaných ako kapilárne javy alebo kapilárne vlastnosti kvapalín. Vlastný princíp kapilárnych metód spočíva vo využití vztlínivosti a zmáčanlivosti vhodných kvapalín (penetrantov), ich farebnosti alebo fluorescencie. Týmto kvapalinami sa pokrýva skúšaný povrch tak, aby mohli vniknúť do necelistvostí vychádzajúcich na tento povrch. [7]

Kapilárnymi metódami možno zisťovať iba vady vyúsťujúce na povrch tak, že do nich táto kvapalina (penetrant) môže vniknúť. Nie je možné zisťovať vnútorné vady materiálu.

Kapilárnymi metódami možno skúšať:

- a) kovové materiály (ocel', farebné, ľahké kovy a ich zliatiny a iné)
- b) nekovové materiály (plastické hmoty, glazovaná keramika, sklo a iné)

Pre praktickú aplikáciu kapilárnych metód je nutnou podmienkou použitie vhodných, kapilárne aktívnych penetrantov, ktoré dobre prenikajú do vád a po odstránení ich prebytku z povrchu ľahko opäť vzliňajú k povrchu. Takéto kvapaliny musia mať preto vyššie povrchové napätie, malý krajový uhol a nízku viskozitu. Tieto veličiny musia byť však vo vzájomnom súlade. Krajový uhol je uhol, ktorý zvierá povrch kvapaliny so stenou pevného telesa. Jeho veľkosť závisí na rozdiely povrchového napätia steny tuhého telesa vzhľadom k vzduchu a vzhľadom ku kvapaline. Tomuto rozdielu sa hovorí adhézna konštanta. Ak je adhézna konštanta kladná, je krajový uhol ostrý a kvapalina stenu zmáča (okraj kvapaliny sa u steny zdvíha). Ak je adhézna konštanta záporná, krajový uhol je tupý a kvapalina stenu nezmáča (okraj kvapaliny je u steny znížený). Podľa tohto hľadiska rozdeľujeme kvapaliny na zmáčavé a nezmáčavé. Ako príklad dôležitosti spoločného výskytu všetkých troch vyššie spomenutých vlastností v určitom súlade, možno uviesť vodu: tá sa vyznačuje vysokým povrchovým napätím a nízkou viskozitou, ale jej uhol kontaktu (krajový) je s väčšinou pevných látok príliš veľký a preto voda ako penetrant nie je vhodná. [7]

### 1.9.2 Penetranty

Penetrantom nazývame kvapalinu, ktorá sa nanáša na povrch skúšaného materiálu, vniká do povrchových necelistvostí, kde zotrúva v dostatočnom množstve aj po odstránení jej prebytku z povrchu. Následným vzliňaním z necelistvostí ich zviditeľňuje. Penetranty sa skladajú zo zmesi kvapalných ropných produktov a organických rozpúšťadiel. Táto zmes je intenzívne zafarbená na červeno, alebo je v nej rozpustený luminosfór, ktorý by spôsoboval svetielkovanie po ožiarení, napr. UV svetlom. [7]

Penetranty sa rozdeľujú podľa niekoľkých hľadísk, rozdelenie podľa toho aký typ indikácie vytvárajú:

- a) penetranty farebné – zaručujú výrazný farebný kontrast s bielou vývojkou
- b) penetranty fluorescenčné – svietia pri ožiarení UV žiarením
- c) penetranty dvojúčelové – obsahujú luminosfór, ktorý je zároveň farbivom

Podľa zmývateľnosti penetrantu vodou rozlišujeme:

- a) penetranty nezmývateľné – vodou sa odstraňujú nedokonallo, čistý oplach vodou k odstráneniu detekčnej kvapaliny nestačí
- b) penetranty zmývateľné – obsahujú emulgátor, ktorý umožňuje ich prebytok odstraňovať vodou [7]

Na detekčné kvapaliny je kladená celá rada nárokov, ku ktorým je potrebné prihliadať pri voľbe vhodného penetrantu pre daný účel. Sú to:

1. Penetračná schopnosť – vlastnosť detekčnej kvapaliny rýchlo prenikať do povrchových necelistvostí a udržať sa v nich i po ďalšiu pracovnú fázu
2. Prchavosť – má byť čo najmenšia. Príliš prchavé penetranty môžu v necelistvostiach zasychať a pri hromadnom skúšaní v nádržiach zhoršujú pracovné prostredie a zvyšujú nebezpečenstvo požiaru
3. Bod vzplanutia – teplota, pri ktorej horľavé pary danej látky vytvoria za štandardných podmienok explozívnu zmes bezprostredne na celom povrchu kvapaliny, ak je prítomný plameň. Z bezpečnostných dôvodov je požiadavkom, aby penetranty mali bod vzplanutia vyšší ako 50 °C. Kde sa pracuje s malým množstvom penetrantu možno tolerovať aj nižšiu hodnotu bodu vzplanutia.

4. Chemická odolnosť – penetranty musia byť chemicky odolné a nekorozívne ku skúšanému materiálu i k nádobám, v ktorých sú prechovávané. Väčšina bežných penetrantov tento požiadavok splňa.
5. Rozpúšťacia schopnosť nosného média – nosné kvapaliny penetrantov musia byť dobrými rozpúšťadlami farbiva alebo luminosfóru, ktoré musia udržať v roztoku ako za normálnej teploty, tak pri teplotách nad a pod rozsahom použiteľnosti. Koncentráciou farbiva alebo luminosfóru je totiž priamo ovplyvnená sýtosť indikácie chýb.
6. Toxicita a zápach – penetranty musia byť nejedovaté a pokiaľ možno takmer bez zápachu, takže ak sú používané predpísaným spôsobom, nemôže dôjsť k poškodeniu ľudského organizmu. [7]

### 1.9.3 Vývojky

Kapilárna vývojka je činidlo, ktorá sa po odstránení prebytku penetrantu nanáša na skúšaný povrch predmetu, kde napomáha vzlínaníu penetrantu z necelistvostí a spoločne s ním vytvára kapilárne indikácie.

Základom všetkých druhov kapilárnych vývojok je práškovitá zložka bielej farby, jemného zrnienia, ktorá nesmie byť hygroskopická. Používajú sa najčastejšie tieto látky: oxid zinočnatý, horečnatý, uhličitan horečnatý, vápenatý (krieda), amorfné kremičitany, kaolín, mastek, bentonity a iné. Druhou zložkou vývojky je nosné prostredie, ktorým môže byť vzduch, voda, acetón, lieh, benzín a iné. [7]

Hlavnou úlohou vývojky je vytvoriť a zvýrazniť indikáciu necelistvosti, aby bola dobre viditeľná. Vývojka funguje do určitej miery ako sací papier. Jednotlivé častice vývojky vytvárajú kapilárny systém, ktorý napomáha vzlínaníu penetrantu z necelistvostí na povrch. Ďalšou úlohou vývojky, hlavne u farebnej metódy, je maskovanie okolitého povrchu necelistvosti, väčšinou bielym zafarbením a tým zvýšenie kontrastu indikácie necelistvostí. U fluorescenčných postupov sa maskovanie povrchu nevyžaduje. Vývojka zvyšuje jas indikácie absorpciou alebo adsorpciou penetrantu.

Kapilárne vývojky rozdeľujeme podľa druhu nosného prostredia na tri základné druhy:

- a) suché vývojky – nosným prostredím je buď vzduch alebo vhodný hnací plyn. Vývojky sa na skúšaný povrch naprašujú.

- b) mokré vývojky prchavé – práškovitá zložka vývojky je rozptýlená v prchavom rozpúšťadle, napr. v acetóne. Vývojky sa na skúšaný povrch nanášajú striekacími pištoľami, sprejmi, rozprašovačmi apod.
- c) mokré vývojky vodné – práškovitá zložka vývojky je rozmiešaná vo vode, ktorá obsahuje ešte zmáčadlo, prípadne retardačné prísady. Vývojky sa väčšinou predhrievajú až na 65 °C a nanášajú sa ponorením skúšaného predmetu do vývojkového kúpeľa. V tomto prípade odpadá sušenie povrchu po oplachu vodou pri odstraňovaní prebytku detekčnej kvapaliny. [7]

Ak má vývojka ktoréhokoľvek typu spoľahlivo pracovať v čo najširšom rozsahu, musí sa vyznačovať určitými vlastnosťami, ktoré možno zhrnúť nasledovne:

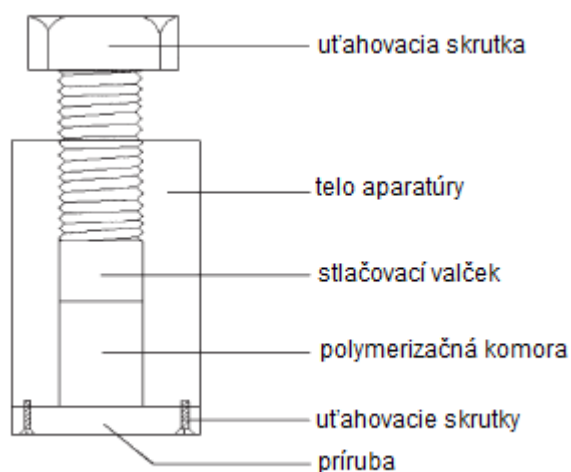
- 1) výborná absorpčná schopnosť, napomáhajúca vzlínaníu dostatočného množstva penetrantu z necelistvostí
- 2) jemná zrnitosť, aby indikácie väd boli ostro ohraničené a výrazné
- 3) musí čo najviac maskovať farbu pozadia, tj. farbu povrchu materiálu
- 4) musí sa ľahko nanášať a vytvárať jemný povlak
- 5) musí sa ľahko zmáčať detekčnou kvapalinou
- 6) pri fluorescenčnom postupe nesmie mať vývojka vlastnú fluorescenciu, ani nesmie ultrafialové žiarenie pohlcovať
- 7) musí byť ľahko odstraniteľná z povrchu súčastí
- 8) nesmie poškodzovať skúšaný materiál ani jeho povrch
- 9) nesmie škodiť ľudskému organizmu [7]



## 2 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

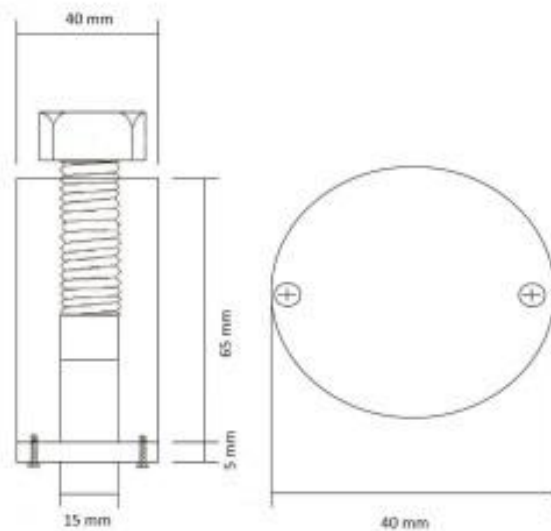
### 2.1 Návrh aparatury

Prvé experimentálne vzorky boli pripravené v aparátúre z Obrázku 8, ktorá pozostáva z: tela aparatury zhotovenej z konštrukčnej oceli, uťahovacej skrutky na ktorej konci je nasadený valček z teflónu. Uťahovaním skrutky vzniká tlak na zmes, ktorý je potrebný na jej správne vytvrdenie a usporiadanie častíc NaCl.



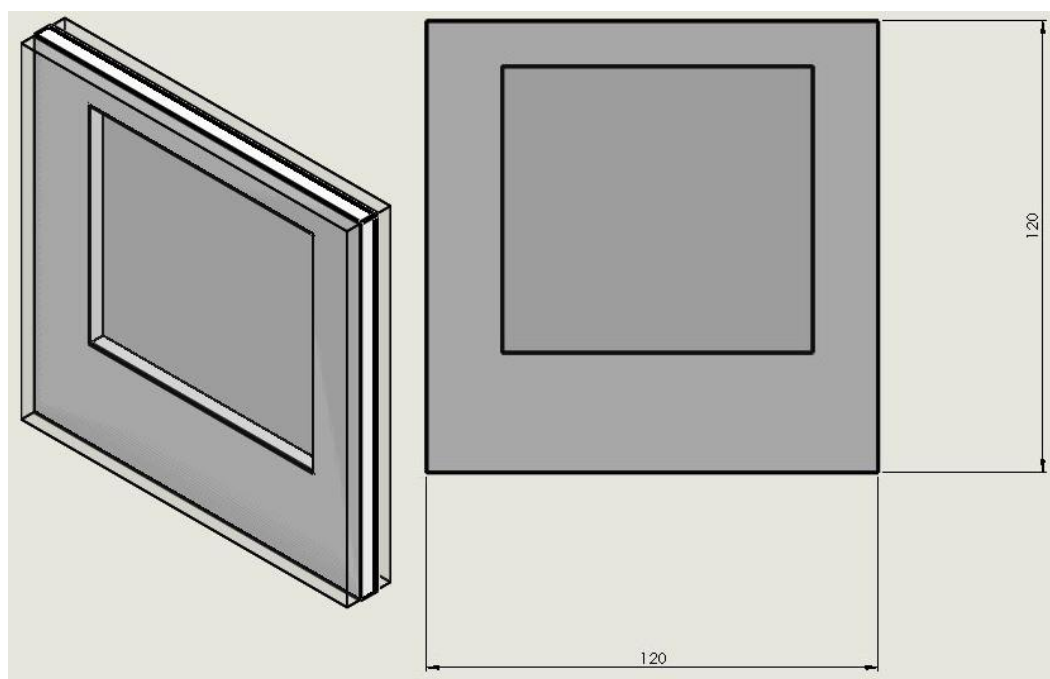
Obrázok 8 Aparatúra na výrobu hydrogélu [15]

Pri návrhu aparatury som sa inšpiroval aparátúrou použitou na Ústave Makromolekulárnej chémie v Prahe. Detailnejší pohľad na aparatúru a jej rozmery je na Obrázku 9. Pre prvotné experimenty som zvolil ako konštrukčný materiál oceľ, pre jej cenu a ľahkú obrábateľnosť.



Obrázok 9 Návrh aparatury [15]

Po prvých experimentoch s HEMA sa ukázalo, že tento typ formy zhotovený z ocele nie je príliš vhodný. Vzorka sa prilepila k stenám formy a nebolo možné už formu otvoriť. Preto som pri ďalších experimentoch s HEMA použil formu zloženú z dvoch sklenených dosiek, medzi ktorými je uložená teflóňová podložka, ktorá zabráňuje prilepeniu hydrogélu na sklo a nakoniec plátok gummy do ktorého je vyrezaný štvorcový otvor. Na obrázku 10 je detailnejší pohľad na túto formu. Horná vrstva formy je takisto zo skla, aby bol zabezpečený prechod UV žiarenia na zmes, pretože pri ďalších pokusoch som už použil iniciátor polymerizácie založený na UV žiarení.



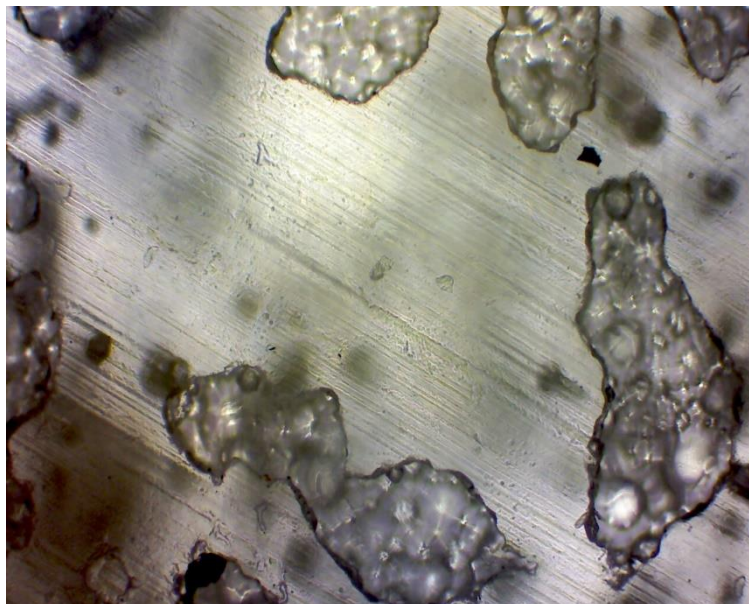
*Obrázok 10 Forma na UV vytvrdzovanie polyméru*

## 2.2 Návrh zmesi

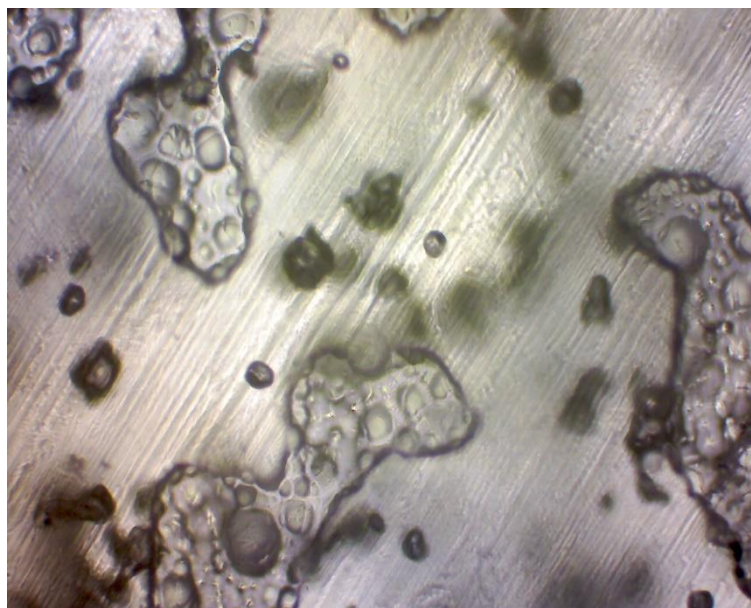
Pri príprave prvých experimentálnych vzoriek som najprv použil Dentakryl na otestovanie aparatury namiesto materiálu HEMA z dôvodu jeho nedostatku a vysokej cene. Aj keď dentakryl nepatrí medzi biokompatibilné materiály, teda nedokáže sa samovoľne rozložiť v ľudskom tele ako HEMA a je vhodný iba na prvotné experimenty. Pri výrobe implantátov som používal NaCl s veľkosťou zŕn 0,05 mm a KCl s veľkosťou zŕn 0,02 mm.

### 2.2.1 Dentakrylový implantát s KCl

Pri tomto experimente som vyrobil Dentakryl v pomere 2:1 prášku k tekutine. Do zmesi som následne pridával KCl až do okamihu kedy bola zmes hustá ako pasta. Takto vytvorenú zmes som vliadol do formy, ktorú som uzavrel prírubou a doťahovaním skrutky som v komore na zmes vytvoril dostatočne veľký tlak. Následne som celú aparaturu vložil na 30 minút do pece nahriatej na 60°C. Po vybratí z pece a otvorení formy som z nej vytlačil už vytvrdený valček dentakrylu s KCl, ktorý som vložil do vody aby sa KCl z dentakrylu vymyla. Po hodine som valček vybral, osušil a vložil pod optický mikroskop. Na obrázku 11 a 12 je zobrazená povrchová štruktúra, kde vidno aj jednotlivé kryštáliky KCl, ktoré sa ale ani po dlhšom časovom úseku vodou z dentakrylu nevymyli.



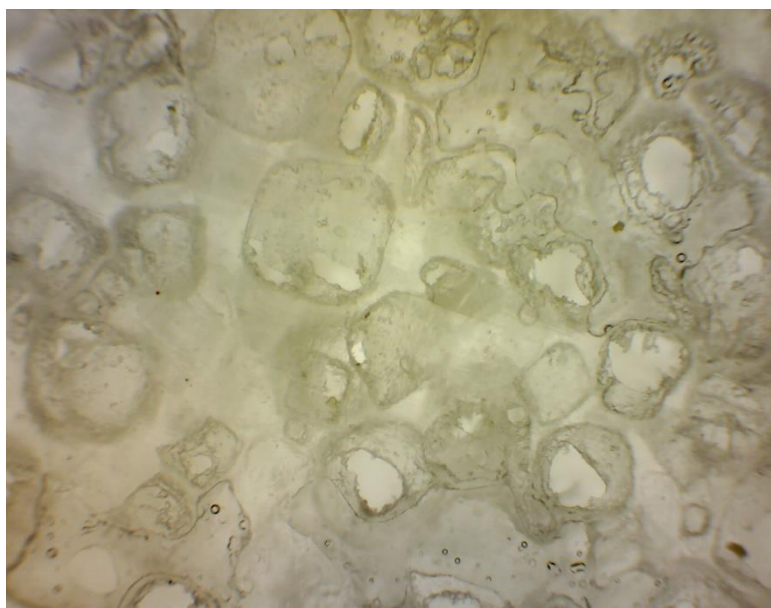
*Obrázok 11 Dentakryl s KCl - povrchová štruktúra*



*Obrázok 12 Dentakryl s KCl - povrchová štruktúra*

### **2.2.2 Dentakrylový implantát s NaCl**

Postup experimentu som zvolil rovnaký ako v prvom prípade. Vytvoril som zmes v pomere 2:1 do ktorej som pridával tentoraz klasickú soľ NaCl až kým nevznikla hustá pasta. Takto vytvorenú pastu som vliat do formy, ktorú som uzavrel prírubou a utiahnutím skrutky som vytvoril dostatočne veľký tlak. Aparatúru som vložil na 30 minút do pece predhriatej na 60 °C. Následne som vložil valček do vody a nechal NaCl vyplaviť. Po hodine som ho vložil znova pod mikroskop, kde už na Obrázku 13 vidno ako sa časť NaCl vyplavila a vytvorila malé tunely na povrchu.



*Obrázok 13 Dentakryl - vyplavená NaCl*

Následne som vytvoril ešte jednu vzorku s dentakrylom, kde som ale použil malé množstvo soli a tá neprenikla celým objemom ale na povrchu sa zoskupila do štruktúry ktorá je vhodná pre tieto implantáty. Povrchová štruktúra tohoto vzorku je na Obrázku 14. Táto vzorka je síce nepodarkom, kdeže som použil málo soli a tá neprenikla celým objemom ale je vidno ako by malo vyzerat' usporiadanie tunelov pre implantáty na použitie v nervovej sústave.



*Obrázok 14 Dentakryl - NaCl usporiadaná na povrchu*

### **2.2.3 HEMA**

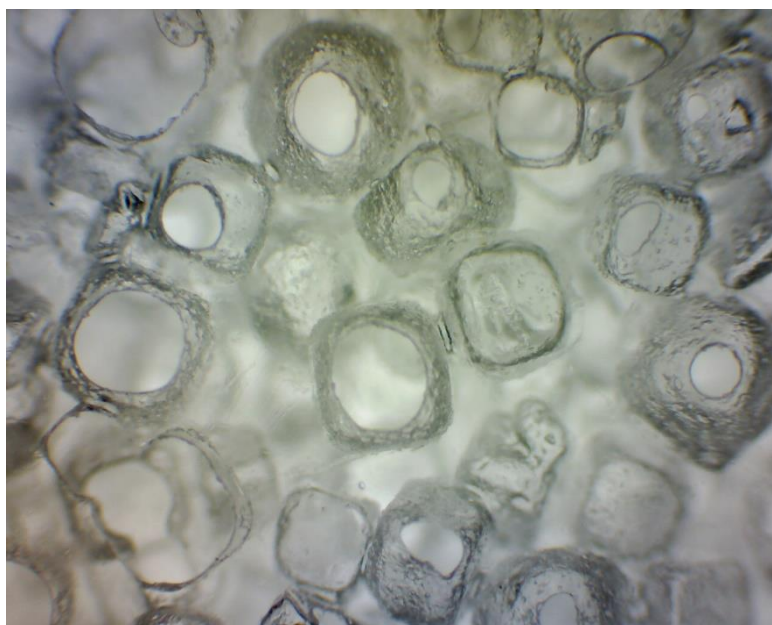
Pre výrobu 1. vzorky z 2-hydroxid ethylmethakrylátu som použil sklenenú formu aby ho bolo možné vytvrdiť UV žiarením. Pre zmes som použil nasledujúce látky: HEMA, ethylén glykoldimetakrylát (EDMA), benzoin ethyl éter (BEE), NaCl a destilovanú vodu.

Postup výroby:

- Ako prvé som navážil 3,5 gramu základného monoméru HEMA, 22 mg sieťovacieho činidla EDMA, 26,5 mg iniciátora polymerizácie BEE, 2 g destilovanej vody a 11 g NaCl.
- Takto vytvorenú zmes som miešal pomocou magnetickej miešačky po dobu 5 minút aby vznikla homogénna zmes.
- Zmes som vliat do pripravenej formy a dal vytvrdiť pod UV žiarič na 15 minút.
- Po vytvrdení a vybratí z formy som vyrezal malú časť hydrogélú a vložil ju do vody aby sa vypláchla NaCl.



- Po vypláchnutí NaCl a osušení vzorku som pod mikroskopom sledoval štruktúru, ktorú je vidno na Obrázku 15.



Obrázok 15 HEMA - povrchová štruktúra

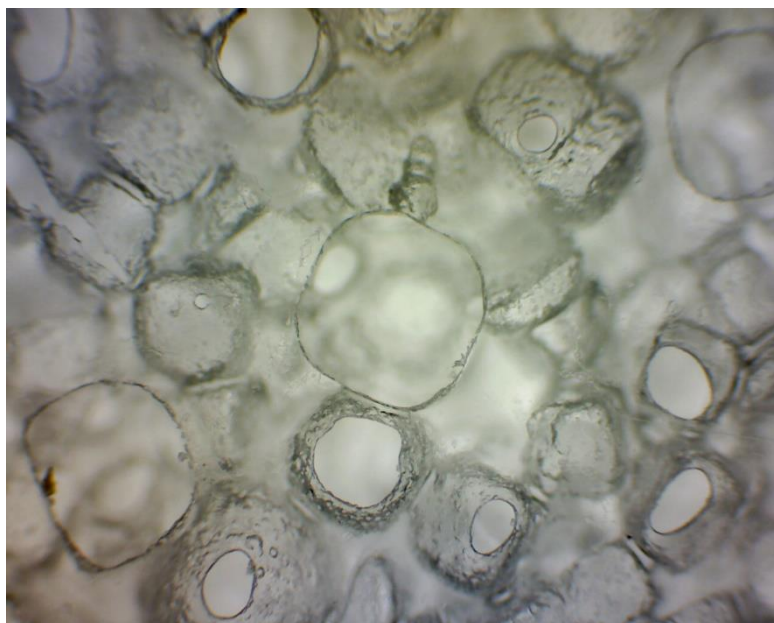
Na povrchovej štruktúre je vidno vytvorené tunely po vypláchnutej soli, ich usporiadanie je však chaotické z dôvodu absencie tlaku pri vytvrdzovaní. Týmto spôsobom som vytvoril makroporézny hydrogél, ktorý je na dotyk mäkký, stlačiteľný a dokáže absorbovať veľké množstvo vody.

Rovnicou 1 z kapitoly 1.6 je možné určiť približné množstvo pórov (častíc NaCl) v materiáli na  $1 \text{ cm}^3$ :

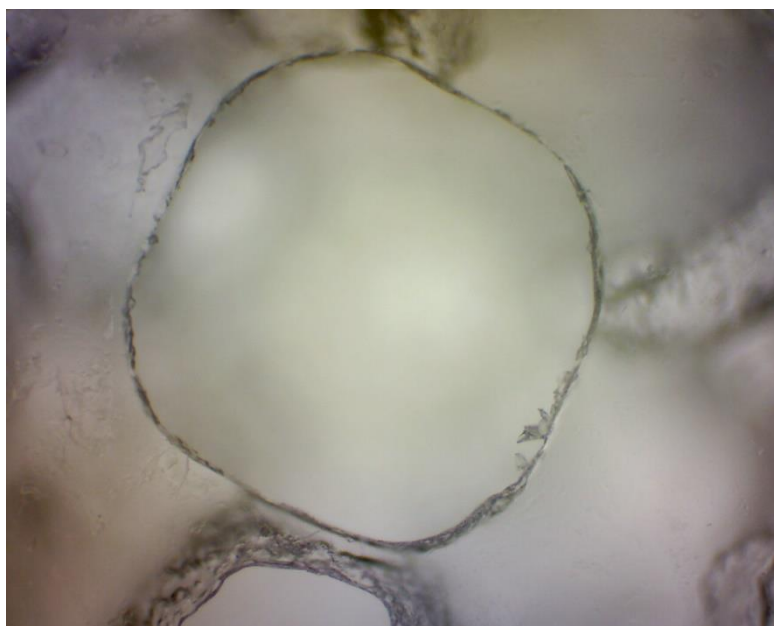
$$n = \frac{m_{NaCl}}{\left[ \rho_{NaCl} \frac{4}{3} \pi \left( \frac{d}{2} \right)^3 V_H \right]} = \frac{11}{2,16 \cdot \frac{4}{3} \pi \cdot \left( \frac{0,05}{2} \right)^3 \cdot 12} = 6484 \text{ pórov} \quad (5)$$

$V_H$  je objem vytvoreného vzorku

Na Obrázku 16 a 17 sú priblížené jednotlivé póry na povrchu, ktoré pokračujú hlbšie do materiálu a napájajú sa jeden na druhý. Týmto vznikla vo vnútri tunelová štruktúra vďaka ktorej získal materiál svoju pružnosť a mäkkosť a schopnosť pohlcovať veľké množstvo vody.



*Obrázok 16 HEMA - pohľad na porézny povrch*



*Obrázok 17 HEMA - bližší pohľad na samotný pór*

Pri navrhovaní ďalších vzoriek som menil vlastnosti hydrogélu zmenou zloženia. Menil som pomer základného monoméru HEMA k obsahu vody. V tabuľke 2 je spracovaný prehľad úspešných aj neúspešných vzoriek a ich zloženia. Posledný stĺpec tabuľky pojednáva o úspechu a neúspechu pokusu. Za neúspešný pokus považujem takú vzorku, ktorá nemá požadované vlastnosti, veľké množstvo soli vytvorilo množstvo pórov na malom objeme a štruktúra nebola tým pádom dostatočne pevná a zrútila sa. Pri použití veľkého množstva vody alebo PEG 200<sup>11</sup> dochádza pri neúspešných pokusoch k neúplnej polymerizácii vzorku, čo sa prejavuje ako mazľavý povrch vzorky alebo časť nezpolymeruje vôbec. Za úspešnú vzorku považujem takú, ktorá dosahuje parametrov popísaných v zahraničnej literatúre, teda rovnomerné rozloženie pórov, flexibilita, stlačiteľnosť, nezávadnosť pre ľudské telo.

Tabuľka 2 Zloženie jednotlivých implantátov

Zloženie								
-	HEMA	EDMA	BEE	H <sub>2</sub> O	NaCl	KCl	PEG 200	-----
1	3,5 g	0,04 g	0,03 g	3,77 g	-----	15,65 g	-----	úspech
2	4,7 g	0,025 g	0,03 g	6,2 g	16,68 g	-----	-----	neúspech
3	3,5 g	0,022 g	0,0265 g	2 g	11 g	-----	-----	úspech
4	2,3 g	0,022 g	0,03 g	-----	11 g	-----	6,22 g	neúspech
5	2,3 g	0,022 g	0,03 g	1,1 g	11 g	-----	3,8 g	úspech
6	3,5 g	0,04 g	0,03 g	2,8 g	-----	11 g	-----	úspech
7	3,1 g	0,02 g	0,03 g	2,5 g	11 g	-----	2 g	úspech

Z Tabuľky 2 vyplýva, že neúspechom skončili vzorky, ktoré obsahovali väčšie množstvo H<sub>2</sub>O alebo PEG 200 ako samotnej HEMA. Buď sa vôbec nevytvrдили pod UV žiarením alebo sa ich štruktúra časom rozpadla.

<sup>11</sup> PEG 200 – polyethylénglykol, číslo značí molárnu hmotnosť



Do Tabuľky 3 pridávam prehľad vonkajších vlastností jednotlivých implantátov.

*Tabuľka 3 Prehľad vlastností implantátov*

Prehľad vlastností jednotlivých vzoriek	
1	tvrdý, ohybný iba navlhčený, po vysušení stráca ohybnosť
2	rozpadol sa po vybratí z formy, nezpolymeroval
3	mäkký, stlačiteľný ako špongia, ohybný aj po vysušení
4	veľké množstvo PEG 200 spôsobilo nedokonalé zpolymerovanie, mazľavý povrch, ohybný ale krehký
5	po vyplavení NaCl sa začal rozpadávať, navlhčený ohybný, po vysušení stráca ohybnosť, mäkký
6	tvrdý, ohybný iba navlhčený, po vysušení stráca ohybnosť
7	mäkký, stlačiteľný, ohybný iba navlhčený, po vysušení stráca ohybnosť

Z výsledkov vyplýva, že veľké množstvo H<sub>2</sub>O alebo PEG 200 má za následok nedostatočné vytvrdenie implantátu. Pri niektorých pokusoch som použil KCl namiesto NaCl, bolo to iba z dôvodu, že KCl ktorú som mal k dispozícii mala menšiu veľkosť zŕn a tým som mohol dosiahnuť menší priemer pórov. Vzorky s KCl mali podobné vlastnosti ako zvyšné vzorky, jediný rozdiel bol v tom, že vďaka menšiemu priemeru pórov stratili svoju ohybnosť. Ale platí to iba ak sú vysušené. Po navlhčení a nasiaknutí vodou materiál získa znova svoju prirodzenú ohybnosť. To platí pre každú vzorku a vyplýva to z vlastností samotného HEMA materiálu. Najlepšie vlastnosti mali vzorky 1,3 a 6 s ktorými som aj ďalej pracoval a testoval ich priechodnosť pomocou detekčných kvapalín, viď. Kapitola 2.4.

## 2.3 Výpočty množstva pórov v implantátoch

Pomocou rovnice z kapitoly 1.6 je možné vypočítať približné množstvo pórov v 1 cm<sup>3</sup>. Výpočty uvádzam len pre 6 implantátov, ktoré som ďalej aj testoval kapilárnymi metódami.

**Vzorka č.1:**

$$n = \frac{m_{KCl}}{\left[ \rho_{KCl} \frac{4}{3} \pi \left( \frac{d}{2} \right)^3 V_H \right]} = \frac{15,65}{1,98 \cdot \frac{4}{3} \pi \cdot \left( \frac{0,02}{2} \right)^3 \cdot 12} = 157246 \text{ pórov}$$

(6)

**Vzorka č.3,5,7:**

$$n = \frac{m_{NaCl}}{\left[ \rho_{NaCl} \frac{4}{3} \pi \left( \frac{d}{2} \right)^3 V_H \right]} = \frac{11}{2,16 \cdot \frac{4}{3} \pi \cdot \left( \frac{0,05}{2} \right)^3 \cdot 12} = 6484 \text{ pórov}$$

(7)

Tieto vzorky by mali mať rovnaký počet pórov na 1 cm<sup>3</sup>, pretože som pri ich výrobe použil stále 11 g NaCl.

**Vzorka č.6:**

$$n = \frac{m_{KCl}}{\left[ \rho_{KCl} \frac{4}{3} \pi \left( \frac{d}{2} \right)^3 V_H \right]} = \frac{11}{1,98 \cdot \frac{4}{3} \pi \cdot \left( \frac{0,02}{2} \right)^3 \cdot 12} = 110525 \text{ pórov}$$

(8)

**Vysvetlivky k rovniciam:**

$m_{KCl}, m_{NaCl}$  – hmotnosť použitej soli

$\rho_{KCl}, \rho_{NaCl}$  – hustota

$d$  – priemerná veľkosť častíc

$V_H$  – objem vytvoreného vzorku, v tomto prípade beriem do úvahy objem celej vzorky vo forme, pre svoje pokusy som vyrezal z formy vždy len tú najlepšiu časť

## 2.4 Testovanie priechodnosti vzorkov kapilárnou metódou

Pri testovaní mojich vzoriek som použil červený penetrant v spreji MR 68 od firmy MR Chemie a vývojku CRC Crick 130.

MR 68 je vodou a rozpúšťadlami zmývateľný červený penetrant. Neobsahuje minerálne oleje, je založený na báze glykolov. Je vhodný na kovy ale takisto aj na keramiku a plasty. [13]



Obrázok 18 M68 penetrant [12]

Pri testovaní kapilárnymi metódami je potrebné použiť aj vývojku, v mojom prípade CRC Crick 130. Je to rýchlo schnúca vývojka pre nedeštruktívne testovanie povrchov a štruktúr. Zlepšuje vizuálnu detekciu povrchových defektov a štruktúr. Pri nanášaní vytvorí biely práškový povlak, ktorý do niekoľkých minút zaschne na povrchu. [19]



Obrázok 19 Vývojka CRC Crick 130 [11]

Na povrchu je viditeľný biely povlak od vývojky, cez ktorý prerazil penetrant cez celý objem materiálu. Táto metóda sa používa hlavne na testovanie malých prasklín a nedokonalostí na povrchu na detekciu prerazeného penetrantu sa používajú rôzne metódy. V mojom prípade postačuje vizuálna kontrola, pretože už len z princípu, že je implantát pórovitý sa očakáva prerazenie penetrantu na celom povrchu, čo sa aj stalo. Všetky uvedené vzorky sú ofotené zo strany na ktorej sa nachádza vývojka a na ktorej sa teda malo prejaviť vzlihanie penetrantu.

**Vzorka č. 1:**



Pri tejto vzorke je na prvý pohľad vidno jemnú povrchovú štruktúru, z dôvodu použitia KCl, ktorá má zrná s malým priemerom vznikli póry, ktoré voľným okom takmer nevidno. Penetrant aj napriek tomu prešiel celým objemom skrz implantát.

**Vzorka č.3:**



Na povrchu je vidno niekoľko veľkých dier, ktoré sa vytvorili kvôli väčším zlepeným kryštálom soli, ktoré mali väčší priemer než zvyšok zŕn soli.

**Vzorka č.5:**



Jediná vzorka, cez ktorú penetrant neprešiel celým objemom. Je to pravdepodobne spôsobené nedostatočným rozložením soli v objeme počas polymerizácie. Z dôvodu, že je nepriechodný len na takej malej časti, považuje sa výsledok za úspech.

**Vzorka č.6:**



Takisto ako vzorka č.1 bol vytvorený pomocou KCl, teda má menšie priemery pórov. Penetrant ale prešiel cez celý objem na druhú stranu implantátu.

**Vzorka č.7:**



Najvydarenejšia vzorka, pri výrobe ktorej som použil PEG 200. Penetrant prešiel cez celý objem. Má špongiovitú štruktúru a pri malom navlhčení sa stáva ohybným.



# ZÁVER

V tejto bakalárskej práci som sa zoznámil so situáciou, ktorá nastáva po poranení miechy a s liečbou týchto poranení pomocou hydrogélových materiálov. Následne som vyrobil niekoľko experimentálnych vzoriek. Cieľom týchto experimentov bolo zistiť ako vplývajú jednotlivé vonkajšie faktory na tvorbu kanálikov za pomoci NaCl v Dentakryle a v HEMA. Z experimentov vyplynulo, že v Dentakryle sa pravidelné usporiadanie soli nedá dosiahnuť zmenou tlaku, kanáliky sa nikdy nevytvorili pozdĺž celého objemu a teda ho nie je možné použiť ani ako lacnú náhradu pri experimentovaní s tlakom a množstvom soli. Pri experimente s HEMA som použil minimálny tlak kvôli sklenenej forme a vytvrdzovanie UV žiarením. Používal som vysoké množstvá soli, niekedy až 67 % váhy vzhľadom k celkovej váhe zmesi. Po vytvrdnutí a vyplavení NaCl som získal mäkký, vodou zmáčavý pórovitý materiál, ktorý má chaoticky usporiadané póry ale vďaka jeho biokompatibilite je vhodný na použitie v biomedicíne na implantáty pre nervový systém.

Cieľom mojej práce bolo nielen spraviť teoretický rozbor tejto problematiky, ktorá zatiaľ nebola spracovaná v českom ani slovenskom jazyku ale aj vytvoriť praktickú ukážku materiálovej štruktúry implantátov. Výsledkom mojej práce je niekoľko vzoriek, ktoré aj napriek tomu, že u všetkých je hlavnou zložkou HEMA majú rozličné vlastnosti. Hlavnou úlohou bolo otestovať kapilárnymi metódami priechodnosť pórov. V tomto teste uspeli všetky vzorky, až na jednu, ktorá bola na jednom mieste nepriechodná.

Pri tejto práci som musel spraviť zopár kompromisov, ktoré ovplyvnili výslednú kvalitu vzoriek. Hlavným problémom bola forma, ktorú som chcel použiť ak by som inicioval polymerizáciu teplom. Preto som sa teda rozhodol pre iniciovanie UV žiarením aby som mohol pokračovať v práci. Musel som teda zvoliť formu zo skla, pri ktorej ale absentoval krútiaci moment 10 Nm (viď. návrh prvej formy). Odporúčam pokračovať v práci, ak by sa podarilo vyriešiť problém s aparátúrou, teda vyrobiť ju z materiálu, ktorý by nereagoval so zmesou počas polymerizácie. V tom prípade predpokladám, že by sa pomocou tepelného iniciovania polymerizácie a tlaku mali dostať lepšie výsledky, hlavne čo sa týka usporiadania pórov.

## ZOZNAM LITERATÚRY

- [1] DOSHI, Jayesh a Darrell H. RENEKER. Electrospinning process and applications of electrospun fibers. *Journal of Electrostatics* [online]. 1995, vol. 35, 2-3, s. 151-160 [cit. 2013-12-09]. DOI: 10.1016/0304-3886(95)00041-8. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0304388695000418>
- [2] DUCHÁČEK, Vratislav. *Polymery: výroba, vlastnosti, zpracování, použití*. Vyd. 2., přeprac. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2006, 278 s. ISBN 80-708-0617-6.
- [3] GIBAS, Iwona a Helena JANIK. Review: synthetic polymer hydrogels for biomedical applications. *Chemistry and chemical technology* [online]. 2010, č. 4 [cit. 2013-12-12]. Dostupné z: [http://archive.nbuv.gov.ua/portal/chem\\_biol/chemistry/2010\\_4/07.pdf](http://archive.nbuv.gov.ua/portal/chem_biol/chemistry/2010_4/07.pdf)
- [4] HEJČL, A., P. LESNÝ, M. PŘÁDNÝ, J. MICHÁLEK, P. JENDELOVÁ, J. ŠTULÍK a E. SYKOVÁ. Biocompatible hydrogels in spinal cord injury repair. *Physiological research* [online]. Praha: Academy of Sciences of Czech Republic, Institute of Physiology, 2008, č. 57, s. 121-132 [cit. 2013-11-30]. Dostupné z: [http://www.biomed.cas.cz/physiolres/pdf/57%20Suppl%203/57\\_S121.pdf](http://www.biomed.cas.cz/physiolres/pdf/57%20Suppl%203/57_S121.pdf)
- [5] HE, Jin, Xiu-Mei WANG, Myron SPECTOR a Fu-Zhai CUI. Scaffolds for central nervous system tissue engineering. *Frontiers of Materials Science* [online]. 2012, vol. 6, issue 1, s. 1-25 [cit. 2013-11-30]. DOI: 10.1007/s11706-012-0157-5. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s11706-012-0157-5>
- [6] JHAVERI, Shalin J., Matthew R. HYND, Natalie DOWELL-MESFIN, James N. TURNER, William SHAIN a Christopher K. OBER. Release of Nerve Growth Factor from HEMA Hydrogel-Coated Substrates and Its Effect on the Differentiation of Neural Cells. *Biomacromolecules* [online]. 2009-01-12, vol. 10, issue 1, s. 174-183 [cit. 2013-11-30]. DOI: 10.1021/bm801101e. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bm801101e>
- [7] KOPEC, Bernard. *Nedestruktivní zkoušení materiálů a konstrukcí: (nauka o materiálu IV)*. Vyd. 1. Brno: Akademické nakladatelství CERM, 2008, s. 327-348. ISBN 978-80-7204-591-4.
- [8] LEITNER, B.: Nedeštruktívne skúšanie materiálov –účel, metódy a podniková dokumentácia. In: Slovgas č. 4/2005, SPNZ, Bratislava 2005.
- [9] LI, D. a Y. XIA. Electrospinning of Nanofibers: Reinventing the Wheel?. *Advanced Materials* [online]. 2004-07-19, vol. 16, issue 14, s. 1151-1170 [cit. 2013-12-09]. DOI: 10.1002/adma.200400719. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/adma.200400719>
- [10] LUO, Yi, Kelly R KIRKER a Glenn D PRESTWICH. Cross-linked hyaluronic acid hydrogel films: new biomaterials for drug delivery. *Journal of Controlled Release* [online]. 2000, vol. 69, issue 1, s. 169-184 [cit. 2013-12-15]. DOI: 10.1016/S0168-3659(00)00300-X. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S016836590000300X>



- [11] Maintenance and Repair products. *CRC WebSite* [online]. 2014 [cit. 2014-05-31]. Dostupné z: <http://www.crcind.com/crc/CRCproductdetail.csp?division=&product=CRICK%20130>
- [12] Penetrant testing. *MR-Chemie* [online]. 2014 [cit. 2014-05-31]. Dostupné z: [http://www.mr-chemie.de/en/products/penetrant\\_testing/red\\_dye/](http://www.mr-chemie.de/en/products/penetrant_testing/red_dye/)
- [13] Product information MR® 68 NF. *MR-Chemie: Penetrant testing* [online]. 2014 [cit. 2014-05-31]. Dostupné z: <http://www.mr-chemie.de/mediaDownload.php?mId=1988>
- [14] PROKOPOVÁ, Irena. *Makromolekulární chemie*. Vyd. 2., přeprac. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2007, 207 s. ISBN 978-807-0806-623.
- [15] PŘÁDNÝ, Martin, Petr LESNÝ, Jindřich FIALA, Jiří VACÍK, Miroslav ŠLOUF, Jiří MICHÁLEK a Eva SYKOVÁ. Macroporous Hydrogels Based on 2-Hydroxyethyl Methacrylate. Part 1. Copolymers of 2-Hydroxyethyl Methacrylate with Methacrylic Acid. Collection of Czechoslovak Chemical Communications [online]. 2003, vol. 68, issue 4, s. 812-822 [cit. 2013-11-30]. DOI: 10.1135/cccc20030812. Dostupné z: <http://cccc.uochb.cas.cz/68/4/0812/>
- [16] SYKOVÁ, Eva, Pavla JENDELOVÁ, Lucia URDŽÍKOVÁ, Petr LESNÝ a Aleš HEJČL. Bone Marrow Stem Cells and Polymer Hydrogels—Two Strategies for Spinal Cord Injury Repair. Cellular and Molecular Neurobiology [online]. 2006-12-6, vol. 26, 7-8, s. 1111-1127 [cit. 2013-11-30]. DOI: 10.1007/s10571-006-9007-2. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10571-006-9007-2>
- [17] SHAPIRO, Jenna M. a Michelle L. OYEN. Hydrogel Composite Materials for Tissue Engineering Scaffolds. JOM [online]. 2013, vol. 65, issue 4, s. 505-516 [cit. 2013-11-30]. DOI: 10.1007/s11837-013-0575-6. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s11837-013-0575-6>
- [18] SUBRAMANIAN, Anuradha, Uma KRISHNAN a Swaminathan SETHURAMAN. Development of biomaterial scaffold for nerve tissue engineering: Biomaterial mediated neural regeneration. *Journal of Biomedical Science* [online]. 2009, vol. 16, issue 1, s. 108- [cit. 2013-12-15]. DOI: 10.1186/1423-0127-16-108. Dostupné z: <http://www.jbiomedsci.com/content/16/1/108>
- [19] TCI3 Crick130. *CRC WebSite: Maintenance and Repair products* [online]. 2014 [cit. 2014-05-31]. Dostupné z: <http://www.crceurope.com/wwwcrc/tds/TCI3%20Crick130.pdf>
- [20] WIKIPEDIE. Kyselina hyaluronová [online]. 2013 [cit. 2013-11-30]. Dostupné z: [http://cs.wikipedia.org/wiki/Kyselina\\_hyaluronov%C3%A1](http://cs.wikipedia.org/wiki/Kyselina_hyaluronov%C3%A1)